



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap

Icke-odlingsbara bakterier

Är det framtiden för antibiotikautvecklingen?

Andreas Frank

*Uppsala
2016*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2016:24

Icke-odlingsbara bakterier

- Är det framtiden för antibiotikautvecklingen?

Non-cultivable bacteria

- Is it the future of antibiotic development?

Andreas Frank

Handledare: Johan Gabrielsson, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serie: 2016:24

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: antibiotikautveckling, antibiotikaresistens, isolation chip, *iChip*, teixobactin

Key words: antibiotic development, antibiotic resistance, isolation chip, *iChip*, teixobactin

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	4
Material och metoder	5
Litteraturoversikt.....	6
Antibiotikautveckling – historisk tillbakablick	6
Resistensutveckling	7
Strategier för antibiotikautveckling	8
Isolation chip (<i>iChip</i>).....	10
Teixobactin – första antimikrobiella substansen från <i>iChip</i>	11
Diskussion	14
Problemområden inom human- och veterinärmedicinen.....	14
Minska resistensutvecklingen.....	14
Teixobactin	15
Slutsats.....	16
Referenslista	17

SAMMANFATTNING

Ända sedan genombrottet för antibiotika i början av 1940-talet, har resistensutveckling varit känd och redan 1945 varnades allmänheten, genom Alexander Fleming, för vad som skulle kunna hända. Trots detta har problemen ökat lavinartat dels till följd av oförsiktig användning och otydliga riktlinjer, och dels som en konsekvens av allt färre nya antibiotika på marknaden. Under de sista 10-20 åren har kontrollen över resistensutvecklingen brustit vilket gjort att flertalet myndigheter såsom världshälsoorganisationen (WHO) och World Organization for Animal Health (OIE) uttryckt stor oro för den globala hälsan. Begreppet "One Health" har aldrig varit viktigare då resistensmekanismer är överförbara mellan bakterier och flertalet svårbehandlade infektioner är zoonoser och därmed smittar mellan människor och djur. En lösning på problemet behöver hittas.

Så gott som samtliga antibiotikaklasser som används kliniskt idag upptäcktes mellan 1940 och 1960. Flertalet av dessa är framtagna genom en process där screening gjorts av naturliga bakterieprodukter vilket var framgångsrikt fram till slutet av 1960-talet. Mängden biologiskt material som fanns tillgängligt ansågs då uttömt och processen övergavs till förmån för utveckling av analoger. Analogerna av redan existerande antibiotika var en länge framgångsrik metod men ursprungsmolekylens resistensproblem kvarstår ofta vilket begränsar användningen. Antalet analoger som kan framställas ur en ursprungsmolekyl är också begränsat vilket är en stor anledning till varför det kommer ut allt färre preparat på marknaden idag. Nya klasser av antibiotika som angriper bakterierna på ett unikt sätt är en nödvändighet om de svårbehandlade infektionerna idag ska kontrolleras.

En återgång till den framgångsrika process som ledde fram till de stora antibiotikaupptäckterna skulle kunna ske om tidigare icke-odlingsbara bakterier kunde utnyttjas. Den negativa utvecklingstrend som dominerar idag skulle då kunna vändas. Icke-odlingsbara bakterier utgör uppskattningsvis 99% av den totala bakteriella floran vilket innebär en enorm potential som hittills varit utom räckhåll. En nyligen publicerad teknik, *iChip*, möjliggör produktion av tidigare icke-odlingsbara bakterier. Komplexiteten kring växt av icke-odlingsbara bakterier utför fortfarande ett hinder men trots det kan *iChip*-tekniken öka det tillgängliga biologiska materialet med en tiopotens.

Denna litteraturstudie syftar till att undersöka den nya *iChip*-teknikens potential samt om de framgångsrika åren för antibiotikautveckling går att återupprätta. Kan dessutom nya behandlingsalternativ för de svårbehandlade multiresistenta infektionerna tas fram genom denna teknik?

Utvecklingspotentialen med *iChip*-tekniken är stor vilket skulle kunna få läkemedelsbolag att återigen satsa resurser på nya antibiotika. Några år efter publiceringen av *iChip*-tekniken, upptäcktes den första antimikrobiella substansen, teixobactin vilken visade sig vara överlägsen vancomycin i sin förmåga att avdöda resistenta bakterieinfektioner såsom MRSA och *M.tuberculosis*. Tillsammans med nyligen uppsatta internationella riktlinjer för antibiotikaanvändning kan *iChip*-tekniken vara vad som krävs för att vända den negativa trenden.

SUMMARY

Antibiotic resistance has been known ever since the breakthrough of antibiotics in the 1940s and the public was warned in 1945 by Alexander Fleming of what might happen. Despite this have the problems increased at an alarming rate partly due to inappropriate use and unclear guidelines and partly because fewer new antibiotics reach the market. The control has been lost completely during the last 10-20 years which resulted in reactions from several agencies e.g. World Health Organization (WHO) and World Organization for Animal Health (OIE). Today is antibiotic resistance considered a threat to public health and the concept “One Health” has never been more important, due to transferable resistance mechanisms between bacteria and the fact that several resistant bacterial infections are zoonotic and transmit disease between humans and animals. A solution to the problem needs to be found.

Essentially all clinically used classes of antibiotics today were discovered between 1940 and 1960. The majority of these were developed through a screening process of natural products from bacteria, a successful approach until the end of the 1960s. After years of success the returns from screening natural products diminished due to the limited amount of cultivable bacteria and the platform was abandoned. Identification of analogues to already existing classes became the dominant method of discovery after the 1960s and was successful for decades. Limiting factors with this approach are inherited resistance problems and the fact that there is a limit to the number of analogues which can be made from a single chemical core. The latter disadvantage is in part responsible for the diminishing number of antibiotics that reach the market today. Novel classes of antibiotics which target bacteria in new ways are essential to treat the emerging resistant bacterial infections.

Reviving the successful platform that led to the discovery of the major classes of antibiotics could occur if the previously non-cultivable bacteria could be exploited. The diminishing development tendency seen today could then be reversed. Non-cultivable bacteria represent approximately 99% of all species which constitute a previously unknown potential source of antimicrobial products. A newly published technique, *iChip*, enables production of previously non-cultivable bacteria. The complexity in culturing these bacteria still constitute a problem but nevertheless an order of magnitude higher than the recovery rate using traditional methods can be seen.

This literature study aims to investigate the potential of the new *iChip* technique and if the successful years of antibiotic development can be reestablished. Furthermore can new treatment options for drug resistant bacterial infections be discovered using this technique?

The potential using *iChip* technique is extensive which might encourage pharmaceutical companies once again to invest in antibiotic development. A few years after the publishing of *iChip* technique the first antimicrobial substance, teixobactin, was discovered. Teixobactin was superior to vancomycin in bactericidal activity to several resistant bacterial infections such as MRSA and *M.tuberculosis*. The *iChip* technique together with newly established international guidelines for antibiotic use might be what is required to turn the negative trend.

*"The time may come when penicillin can be bought
by anyone in the shops. Then there is the danger
that the ignorant man may easily underdose himself
and by exposing his microbes to non-lethal quantities
of the drug make them resistant"*

Sir Alexander Fleming

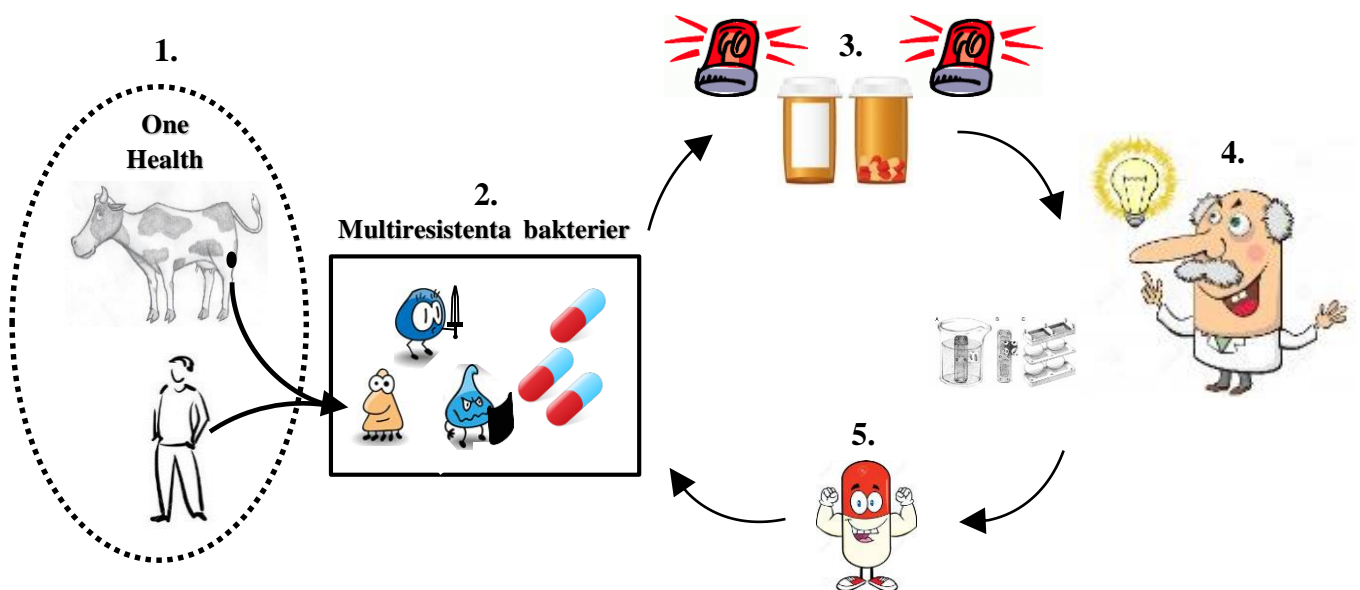
Nobelföreläsning, December 11, 1945

INLEDNING

Resistensutveckling är ett allvarligt hot mot den globala hälsan och en lösning på problemet behöver hittas (Törneke *et al.*, 2015; ECDC, 2015). Den årliga epidemiologiska rapporten från European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2015, beskriver att en fortsatt ökning av resistenta bakterier ses inom humanmedicinen där exempelvis Meticillin-resistenta *Staphylococcus aureus* (MRSA) utgör mer än 25% av samtliga isolerade *S.aureus* i 7 av 29 medlemsländer inom EU/EEA. Den senaste sammanställningen från statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) från 2014 beskriver en fortsatt gynnsam situation i Sverige ur ett globalt perspektiv men samtidigt ses en oroande ökning i humana fall med resistenta bakteriestammar som exempelvis MRSA och de ytterst svårbehandlade multiresistenta bakterierna ur familjen *Enterobacteriaceae* med Extended Spectrum Beta Lactamases, ESBL (resistens mot betalaktamantibiotika med utvidgat spektrum). Även hos djur i Sverige ses ESBL-producerande bakterier där framförallt slaktkyckling utgjort ett problem (Swedres-Svarm, 2014). Flera av de allvarliga bakterierna, däribland ESBL-producerande bakterier, är zoonoser och begreppet ”One Health” lyfts fram av flera myndigheter (FAO/OIE/WHO, 2016). Verksamma antibiotika mot dessa infektioner samt likartade globala regler och riktlinjer för användning inom både human- och veterinärmedicinen behöver tas fram (Törneke *et al.*, 2015; Fischbach & Walsh, 2009).

Ända sedan genombrottet för antibiotika och upptäckten av penicillin så har resistens hos bakterier varit känt. Alexander Fleming varnade redan i sin nobelföreläsning 1945 för problemet men trots det så ökar ständigt resistensutvecklingen. En stor del av resistensproblematiken kommer av en alltför vidlyftig användning av antibiotika, både inom human- och veterinärmedicinen. Detta har resulterat i riktlinjer som arbetats fram både på nationell och internationell nivå för att harmonisera användning och minska onödiga antibiotikaförsäljning (Törneke *et al.*, 2015; WHO, 2012). Resistensutvecklingen har hållits under kontroll genom att ständigt introducera nya preparat på marknaden vilket varit framgångsrikt fram till i början av 2000-talet. En viktig faktor till att man tappat kontrollen på senare år är att utvecklingen av nya antibiotika avstannat (Fair & Tor, 2014).

Flera studier belyser risken med att så få nya antibiotika når marknaden idag, i all synnerhet som behovet av att finna nya antibiotikaklasser är skriande stort (Fair & Tor, 2014; Collignon, 2015). En metod som flera forskare tar upp som ett lovande angreppssätt är användningen av tidigare icke-odlingsbara bakterier och deras naturliga antimikrobiella produkter. Uppskattningsvis utgör 99% av den totala bakteriella floran av hittills icke-odlingsbara bakterier (Pham & Kim, 2012). De essentiella näringsfaktorerna för denna enorma fraktion har inte gått att återskapa *in vitro* med traditionella odlingsmedium som agarplattor eller flytande näringsbuljong (Stewart, 2012). Denna litteraturstudie kommer att avhandla om en återgång till guldåren för antibiotikautveckling är möjlig genom användning av icke-odlingsbara bakterier med hjälp av en nyligen publicerad metod kallad isolation chip (*iChip*). Kan nya effektiva behandlingsalternativ upptäckas för svårbehandlade resistenta bakteriestammar genom användning av detta angreppssätt? Se figur 1 för en grafisk presentation av tankarna bakom denna litteraturstudie.



Figur 1. Schematisk presentation av litteraturstudien. 1. "One health"-begreppet binder samman djur och människor 2. Multiresistenta infektioner som i värsta fall står utan behandlingsalternativ 3. Alarmerande få nya antibiotikaalternativ 4. Ny metod för utveckling av antibiotika 5. Potenta och livsviktiga nya antibiotika når marknaden som kan användas vid livshotande infektioner.

Figur 1 ska illustrera behovet av att finna nya metoder för antibiotikautveckling så potenta nya antibiotikaklasser kan utvecklas och användas vid livshotande infektioner och skydda den globala hälsan hos både människor och djur.

MATERIAL OCH METODER

Litteratursökning har framförallt skett i databaserna Pubmed och bibliotekets databassamling Primo.

Exempel på söksträngar i Primo och Pubmed:

- Antibiotic AND resistance AND development OR history
- Novel AND antibio* AND develop*
- Novel AND antibiotic AND alternative AND development
- Antibiotic AND resistance AND veterinary

Söksträngarna ovan har kombinerats med enskilda sökord då något specifikt eftersökts: Non-cultivable, bacteriophages, *iChip* etc.

Facklitteratur har även inhämtats från SLU-biblioteket genom beställning av ett antal artiklar. Officiella rapporter från WHO, ECDC och Folkhälsomyndigheten har använts för att beskriva rådande resistenssituation. Avgränsningar har till största delen skett genom observation av vad som är aktuellt för valt ämne och genom översiktsartiklar.

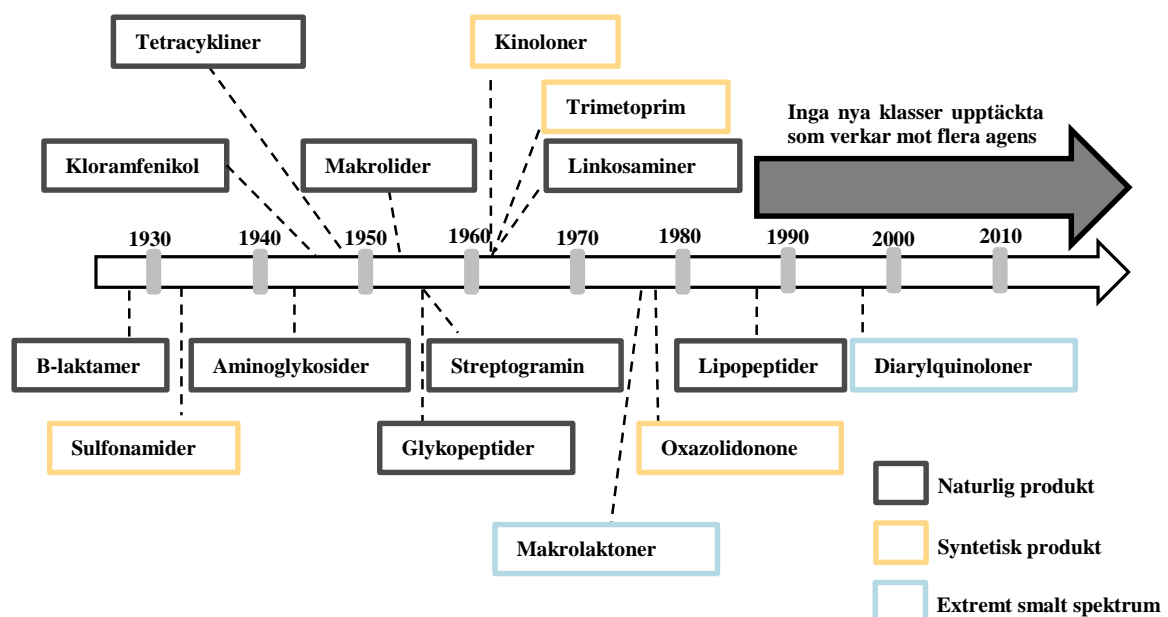
LITTERATURÖVERSIKT

Antibiotikautveckling – historisk tillbakablick

Upptäckten av antibiotika tillhör en av de stora milstolparna inom den moderna medicinen som dramatiskt har förbättrat livskvaliteten och förlängt livslängden för både människor och djur. Den antibiotiska eran tog sin början på 1910-talet med upptäckten av det första sulfaläkemedlet, Salvarsan 1910. Salvarsan användes för att behandla syfilis hos människa och var den mest använda antibiotikan fram till 1940-talet (Zaffiri *et al.*, 2012). Det verkliga genombrottet för den antibakteriella eran kom när Alexander Flemming 1928 revolutionerade världen med upptäckten av penicillin. Denna slumpartade upptäckt introducerades på marknaden 1941 och banade väg för flera årtionden av framgångsrika antibiotikaupptäckter (Zaffiri *et al.*, 2012).

Guldåren för antibiotikautveckling inleddes på 1940-talet då Selman Waksman, utnyttjade bakteriernas egen förmåga att producera antibiotika och utvecklade en metod för utveckling kallad Waksmans plattform. Metoden liknade den Alexander Fleming använde vid upptäckten av penicillin (Lewis, 2012). Detta ledde fram till upptäckten av bakteriegenus *Streptomyces* och streptomycin 1943, den första aminoglykosiden. Denna plattform som använde sig av naturliga produkter från bakterier togs upp av läkemedelsindustrin och under de kommande 20 åren upptäcktes i stort sett alla stora antibiotikaklasser (Lewis, 2013).

Figur 2 visar att de allra flesta antibiotikaklasserna som upptäcktes mellan 1940 och 1960 hade sina ursprung i naturliga bakterieprodukter. På 1960-talet övergavs Waksmans plattform och tillvägagångssättet med utveckling av naturliga bakterieprodukter eftersom materialet ansågs uttömt (Lewis, 2013). Detta banade väg för utveckling av semi-syntetiska och syntetiska antibiotika. Den idag så viktiga syntetiska bredspektrumantibiotikan, flourokinolonerna, har sitt ursprung i kinolonfamiljen som upptäcktes 1962 (Lewis, 2012; Zaffiri *et al.*, 2013).



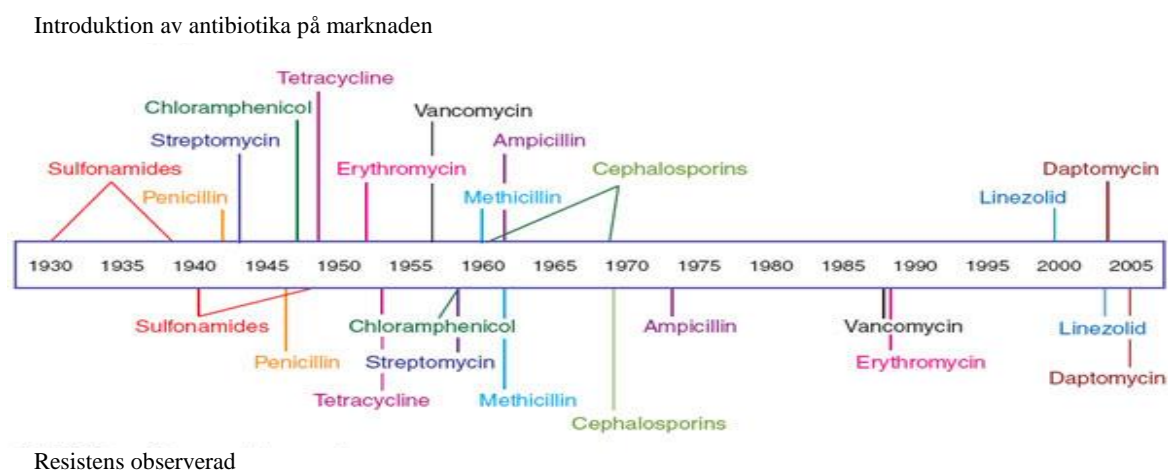
Figur 2. Utveckling av antibiotika. Figur modifierad efter WHO (2014) och Lewis (2013).

Efter 1960-talet har inga bredspektrumantibiotika upptäckts. Flera naturliga bakterieprodukter eller derivat har utvecklats och godkänts efter 1960-talet men de har baserats på gamla upptäckter. Den sista kliniskt användbara antibiotikaklassen, daptomycin, mot flera bakteriella agens upptäcktes 1986. Daptomycin är en lipopeptid som verkar på grampositivas cellvägg och kom i bruk 2003 (Lewis, 2013). Linezolid, en oxazolidinonantibiotika, togs i bruk år 2000 men upptäckten av substansen gjordes redan på 1970-talet (Fair & Tor, 2014).

Två antibiotikaklasser med extremt smalt spektrum har godkänts på senare tid. Makrolakter, upptäcktes som klass visserligen redan på 1970-talet men introducerades kliniskt först 2011 med effekt mot *Clostridium difficile* (Fair & Tor, 2014). Diarylquinoliner, som endast verkar mot *Mycobacterium tuberculosis* upptäcktes 1997 och togs i bruk 2012 (Fair & Tor, 2014).

Resistensutveckling

Parallellt med att ett nytt antibiotika introduceras på marknaden upptäcks resistensutveckling mot substansen. Generellt observeras resistens inom 2 år efter introduktionen även för nya antibiotikaklasser (Coates *et al.*, 2011). Då mikroorganismer har haft flera miljarder år på sig att genom naturlig selektion förvärva resistens mot mikroorganismer i omgivningen, är det knappast förvånande att resistens också förekommer. En förhoppning fanns tidigt att syntetiskt framställda antibiotika skulle resultera i långsam resistensutveckling, t ex för fluorokinolonerna eller diarylquinolonerna. Tyvärr infriades inte detta utan en snabb resistensutveckling sågs även för dessa syntetiska antibiotika (Coates *et al.*, 2002). Mekanismerna bakom resistensutveckling utgör ett komplext nätverk av faktorer och är inte helt utrett. En förklaringsmodell kan dock vara att substanser som attackerar ett enkelt målprotein som t ex ett enzym, utvecklar snabbare resistens än substanser som samtidigt verkar på flera komplexa mål som i cellmembranet (Coates *et al.*, 2002). Vancomycin är ett exempel på det senare och verkar på bakteriens cellmembran. Substansen upptäcktes på 1950-talet men uppvisade inte resistens förrän ca 30 år senare vilket framgår av figur 3 (Levine, 2006).



Figur 3. Utveckling av resistens. Figur anpassad från Clatworthy *et al.* (2007).

Idag finns resistens dokumenterad hos samtliga antibiotikagrupper som finns på marknaden. Även för de senaste tillskotten i form av diarylquinoloner och makrolakter där resistens observerades redan innan substanserna var tillgängliga på marknaden (Lewis, 2013). Figur 3 visar hur dokumenterad antibiotikaresistens utvecklats inom loppet av 1 – 30 år efter introduktionen.

Hotet från antibiotikaresistens har lett till att flera internationella myndigheter idag anser att problemet allvarligt hotar den globala hälsan (ECDC, 2015; FAO/OIE/WHO, 2016). Begreppet ”One health” har lyfts fram och har aldrig varit viktigare eftersom flera av de svårbehandlade infektionerna, som till exempel MRSA och ESBL-producerande *Enterobacteriaceae*, är zoonoser vilket drabbar både människor och djur och att resistensutveckling i många fall är överförbar mellan bakterier (Collignon, 2015). I den senaste rapporten från ECDC tas både MRSA och ESBL-producerande bakterier upp som särskilt viktiga (ECDC, 2015). MRSA är på vissa håll i Europa ett stort problem inom humanmedicinen representerat av över 25% av det totala antalet isolerade *S.aureus*. ESBL-producerande *Escherichia coli*, resistent mot tredje generationens cefalosporiner utgör också ett stort problem med ökande omfattning. Resistenssiffror varierande från 4.4% (Sverige) till 38.1% (Bulgarien) med en medelresistens över hela Europa på 11.9%. *E.coli* som förvärvat resistens mot karbapenemer så kallade ESBL_{CARBA}, som i många fall utgör sista behandlingsvägen av ESBL-producerande bakterier är fortsatt låg inom Europa. En av de mest svårbehandlade bakteriella infektionerna, ESBL_{CARBA}-producerande *Klebsiella pneumoniae*, utgör ett stort problem globalt sett då få eller inga behandlingsalternativ längre finns (WHO, 2014; ECDC, 2015). I Europa ses en ökande trend med alarmerande siffror från exempelvis Grekland där över 60% av isolaten av *K.pneumoniae* är ESBL_{CARBA}-producerande (ECDC, 2015).

Situationen i Sverige är fortsatt gynnsam med relativt låg resistensutveckling inom både human-och veterinärmedicinen. SVA redovisade i sin senaste rapport dock en ökning av både MRSA (19%), och ESBL-producerande bakterier (9%) inom humanmedicinen i Sverige. Förekomsten av MRSA hos djur är fortsatt låg men sågs bland annat hos häst, hund, katt och nötkreatur. ESBL-producerande *E.coli* har varit ett problem med hög förekomst hos slaktkyckling i Sverige men minskning kunde ses enligt den senaste rapporten från SVA (Swedres-Svarm, 2014).

Strategier för antibiotikautveckling

Guldåren för antibiotikautveckling är sedan länge förbi och de senaste årtiondena har utvecklingen av nya antibiotika gått stadigt ner. Världen producerade mer än 20 nya antibiotikaklasser mellan 1930-1962 (Coates *et al.*, 2011). Till största delen var detta resultatet av en framgångsrik plattform med screening av naturliga produkter (Lewis, 2013). Ett stort antal analoger till existerande klasser har tagits fram. Anledning till varför läkemedelsindustrin producerar färre och färre nya antibiotikaklasser kan delvis bero på att det finns färre och färre nya metabola mål för antibiotika. Ur ekonomisk synpunkt är marknadsföring av en analog bättre än att upptäcka nya klasser (Coates *et al.*, 2011). Svårigheten att finna nya antibiotika och de höga utvecklingskostnaderna har resulterat i att allt färre läkemedelsbolag vågar satsa på antimikrobiell utveckling (Fair & Tor, 2014).

Användning av ett semi-syntetiskt tillvägagångssätt och utvecklandet av analoger till existerande antibiotika har varit helt dominerande de senaste 50 åren. Denna metod tog fart när antibiotikans guldår tog slut på 1960-talet. Nya analoger har varit mycket framgångsrika och kunde kontrollera antibiotikaresistensens utbredning tills för 10-20 år sedan. Idag tillverkas för få nya analoger för att hålla jämna steg med resistensutvecklingen (Fair & Tor, 2014). Utveckling av analoger är på många sätt tilltalande ur ett utvecklingsperspektiv då dessa substanser oftast leder till lägre risk för toxiska effekter. Analogerna har också ofta samma löslighet och proteinbindning som ursprungsmolekylen. Det är även attraktivt ur ett ekonomiskt perspektiv då en del av arbetet redan är gjort vid utveckling av ursprungssubstansen. Nackdelen med denna metod är att det finns en gräns för antalet nya analoger som kan framställas från en grundstruktur (Coates *et al.*, 2011). Nya analoger ärver oftast också en del av samma resistensproblem som redan finns för ursprungsmolekylen på grund av liknande verkningsmekanism eller struktur. Ett problem som gör att det blir absolut nödvändigt att hitta alternativa metoder för upptäckt av nya antibiotikaklasser (Fair & Tor, 2014).

Användning av ett helt syntetiskt tillvägagångssätt har historiskt inte varit så framgångsrikt. Metoder som *High Through-put screening* (HTS) är en automatiserad process som identifierar bindning eller aktivitet för hundratusentals molekyler till en isolerad receptor eller hela celler. Detta möjliggör identifiering av potentiella substanser för utveckling. *Rational drug design* är en strategi där potentiella läkemedelssubstanser utvecklas baserat på analys av den tredimensionella strukturen av ett protein som interagerar med en ligand (Lewis, 2013). En av de största begränsningarna med ett syntetiskt tillvägagångssätt är svårigheten att få dessa molekyler att penetrera bakteriens cellvägg. Detta gäller särskilt gramnegativa bakterier där cellväggens uppbyggnad utgör ett särskilt skydd (Fair & Tor, 2014).

Ett antal lovande alternativa metoder för framställning av nya antibiotika finns beskrivna i litteraturen, men metoderna är i dagsläget inte fullt utvecklade. Tabell 1 listar de mest lovande metodernas för- och nackdelar.

Bakteriofager kan användas som terapimetod mot bakteriell infektion. Bakteriofager dödar bakterier och har använts i behandling på människor i vissa länder (Coates & Hu, 2007). De är specifika och propagerar snabbt men det finns också många barriärer för bakteriofag-terapi. Utveckling av resistens sker relativt lätt vilket gör att man måste ge en cocktail av bakteriofager vilket i sin tur gör tillverkningen svårare (Lewis, 2013). Immunogeniciteten av bakteriofager kan bli problematisk då de kan inducera neutraliserande antikroppar. Vidare så kan en massiv bakteriell lysis leda till toxisk shock (Coates & Hu, 2007).

Utveckling av antimikrobiella peptider utgör ett lovande fält som verkar mot inte bara bakterier utan även virus, svamp och tumörceller. Antimikrobiella peptider är små molekyler (3-5kDa) som produceras av både människor, växter och djur. Ett problem med peptider har varit deras verkningsmekanism som ofta ger upphov till toxiska reaktioner (Lewis, 2013).

Bakterier existerar i två tillstånd i en klinisk infektion, en växande fraktion och en stationär, icke-växande fraktion. En alternativ metod som föreslås är att rikta antibiotika mot denna icke-växande fraktion. Existerande antibiotika riktar sig främst mot den växande fraktionen och är inte alltid så effektiv mot den stationära. Genom att utveckla antibiotika som är effektivare mot

den stationära tros man kunna förkorta behandlingstiden för infektion, effektivare kontrollera sjukdomsutbrott och minska resistensutveckling. Problemen med detta angreppssätt har varit att hitta molekylära mål för antibiotikautveckling då många gener nedregleras hos vilande bakterier samt att det kan finnas olika typer av stationära bakterier vilket utgör ett hinder vid utveckling av antibiotika (Coates & Hu, 2007).

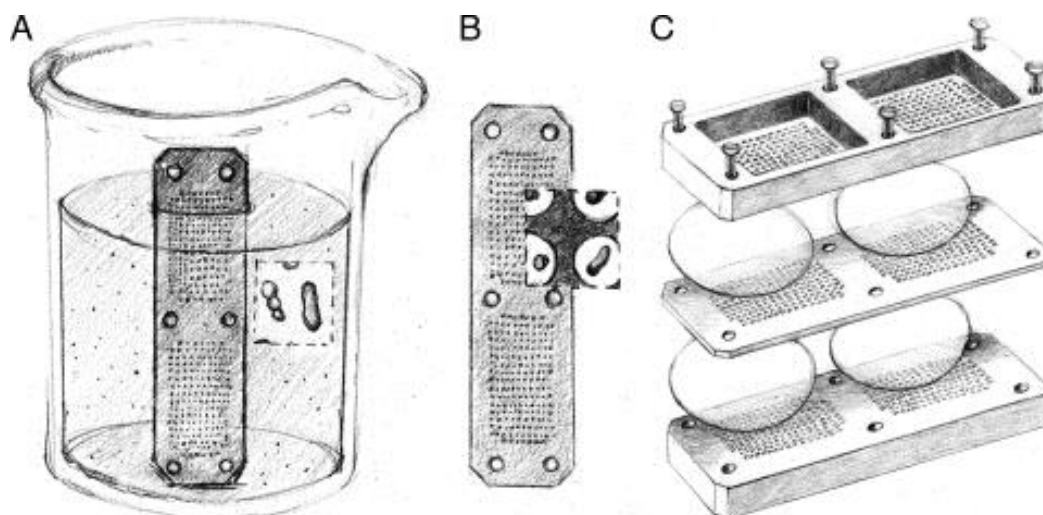
Tabell 1. Alternativa metoder för antibiotikautveckling

	Fördelar	Nackdelar
Bakteriofager	<ul style="list-style-type: none"> • Används i behandling i vissa länder • Specifika • Propagerar snabbt 	<ul style="list-style-type: none"> • Utvecklar lätt resistens • Neutraliserande antikroppar • Toxiska reaktioner
Attackera vilade bakterier	<ul style="list-style-type: none"> • Förkorta behandlingstid • Kontrollera sjukdomsutbrott effektivare • Minska resistensutveckling 	<ul style="list-style-type: none"> • Få molekylära mål • Olika typer av vilande bakterier
Antimikrobiella peptider	<ul style="list-style-type: none"> • Verkar även på virus, svamp och tumörceller 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxiska reaktioner • Svåradministrerade

Det alternativ som av flera framstår som lockande är dock en nystart av det tidigare framgångsrika konceptet med screening av naturliga produkter (Lewis, 2012; Clardy, 2006). Problemet är att den del av bakteriefloran som växer på traditionellt media, flytande eller fast agar, redan undersökts med avseende på antibiotikakandidater och ansetts uttömd sedan länge (Lewis, 2013). För att en nystart ska kunna ske behöver den stora majoritet av bakterier som inte växer på traditionellt media utnyttjas. Metagenomstudier och rRNA-analyser gjorda på jord- och vattenprover har visat att uppskattningsvis 99% av den totala bakteriefloran inte växer under konstgjorda förhållanden (Pham & Kim, 2012). Om denna fraktion skulle kunna odlas skulle det kunna leda till en återuppväckning av Waksmans plattform där screening av naturliga produkter återigen kunde utnyttjas. Detta skulle leda till att ett enormt mycket större material än tidigare blev tillgängligt (Lewis, 2012). Det stora problemet har varit att denna dominerande fraktion inte har gått att kultivera med traditionella metoder (Kaeberlein *et al.*, 2002). Det har tills helt nyligen inte gått att använda sig av denna enorma mängd biomaterial förrän en forskargrupp i Massachusetts, USA, slutligen lyckades (Nichols *et al.*, 2010).

Isolation chip (*iChip*)

Nichols *et al.* presenterade 2010 att de utvecklat en ny metod för att få icke-odlingsbara bakterier att växa. Isolation chip (*iChip*) verkar som en *in situ* kultiveringsmodell där hundratals små diffusionskammare kan laddas med enstaka bakterieceller i varje kammare vilket kan ses i figur 4. Diffusionssystemet möjliggör transport av naturligt förekommande näringsämnen och omgivningsfaktorer då inkubering av chipet sker i den naturliga omgivningen (Nichols *et al.*, 2010). Denna teknik har möjliggjort växt av en mycket större mängd olika mikroorganismer än traditionella media (50% vs 1%) (Sherpa *et al.*, 2015).



Figur 4. *iChip*-tekniken A: Provmaterial löses upp i flytande agar. B: Agarn steltnar. C: Polykarbonatmembran placeras både över och under kammare (Nichols *et al.*, 2010).

Provmaterialet samlas in från jord- eller vattenprover och löses upp i flytande agar. Suspensionen späds för att försäkra att endast en cell placeras per kammare (A). Den flytande agarn steltnar och immobiliserar cellerna i kamrarna (B). Därefter placeras polykarbonatmembran på båda sidorna över enheterna med kammare (C). Detta görs dels för att förhindra cellmigration och dels för att tillåta migration av näring och omgivningsfaktorer in till de isolerade bakteriecellerna. Täckglas med matchande kammare läggs på membranen och skruvas fast och håller membranen på plats (Sherpa *et al.*, 2015). Inkubering av *iChip* görs sedan i den naturliga miljön där proverna togs (Nichols *et al.*, 2010).

Ett större antal bakterier kunde isoleras med *iChip* jämfört med traditionellt media och arterna som observerades skiljde sig markant åt med helt olika genus och möjligen också familjer representerade (Nichols *et al.*, 2015).

Tillväxten av mikroorganismer var nästan 50% i *iChip* jämfört med ca 1% på traditionella media som agarplattor (Ling *et al.*, 2015). Trots att *iChip*-tekniken är framgångsrik på att isolera bakterier är växten av bakterier i *iChip* mängdmässigt liten så avancerade studier av materialet kan inte genomföras. Det innebär att bakteriematerialet behöver överföras till traditionella media för att exponentiellt öka i mängd. Denna process kallas domesticering (Nichols *et al.*, 2010). I detta steg såg författarna fortfarande ett problem då domesticeringen försvårar utväxten av bakterier och totalt kunde ca 10-15% av totala bakteriemängden amplifieras. Detta är trots det relativt låga antalet en tiopotens bättre än odling på traditionellt media (Sherpa *et al.*, 2015).

Utvecklingspotentialen för *iChip* är enorm då screening av tidigare icke-odlingsbara bakterier nu kan genomföras och möjliga substanser med antimikrobiell aktivitet kan upptäckas (Nichols *et al.*, 2010).

Teixobactin – första antimikrobiella substansen från *iChip*

Användbarheten av *iChip*-tekniken demonstrerades redan några år efter publiceringen 2010, då en forskargrupp presenterade den första antimikrobiella substansen som upptäckts på detta sätt.

Forskargruppen demonstrerade att framrenade extrakt från 10 000 *iChip*-isolerade kolonier hade antimikrobiell aktivitet. Detta gjordes genom att tillsätta extrakten till plattor med växande *S.aureus* (Ling *et al.*, 2015).

En ny art av β -proteobakterier som gavs namnet *Eleftheria terrae* visade tydlig aktivitet mot *S.aureus* i försöket. Ansvarig för den antimikrobiella aktiviteten var en 1 242 Da stor molekyl som inte fanns registrerad i någon databas och fick namnet teixobactin. Denna substans utsöndras naturligt från *Eleftheria terrae* som tillhör ett nytt genus som är relaterat till *Aquabacteria*, dvs. en bakteriegrupp som normalt inte är känd för någon antibakteriell effekt (Ling Nature 2015).

I artikeln av Ling *et al.* (2015) gjordes försök som visade att teixobactin hade tydlig antimikrobiell aktivitet med ett lågt "Minimum Inhibitory Concentration" (MIC)-värde mot grampositiva bakterier inklusive flera mycket svårbehandlade resistenta bakteriestammar. I tabell 2 kan aktiviteten av teixobactin ses.

Flera resistenta stammar såsom MRSA, vancomycinresistenta enterokocker (VRE) samt de mycket svårbehandlade infektionerna från *M.tuberculosis* och *Cl.difficile* uppvisade väldigt låga MIC-värden. *M.tuberculosis* är en av de mest svårbehandlade infektionerna på humansidan globalt sett och representerar den andra ledande dödsorsaken av infektiösa agens (Frieden *et al.*, 2014).

Tabell 2. Aktivitet mot patogena mikroorganismer

	Teixobactin MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	0.25
<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE)	0.5
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (penicillin-R)	≤ 0.03
<i>Clostridium difficile</i>	0.005
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	0.125
<i>Escherichia coli</i>	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≥ 32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 32

Teixobactin var baktericid mot *S.aureus* och VISA (Vancomycin intermediate resistant *S.aureus*) och överlägsen vancomycin i att avdöda dessa. Notera att bristande vancomycinbehandling mot MRSA är kopplad till bristande baktericid effekt (Ling *et al.*, 2015). Ur tabell 2 framgår också att teixobactin inte är verksamt mot gramnegativa bakterier som *E.coli*, *P.aeruginosa* och *K.pneumoniae* där ett högt MIC-värde ses.

Teixobactin verkar genom att hämma syntesen av cellväggen genom att binda till lipid II som är en föregångare till peptidoglykan och lipid III, en föregångare till teikonsyra.

Verkningsmekanismen för teixobactin är helt skild från övriga antibiotikaklasser och därför räknas denna substans till en helt ny klass (Ling *et al.*, 2015). Anledningarna till varför gramnegativa bakterier inte angrips beror troligtvis på att teikonsyra saknas i de gramnegativa bakteriernas cellvägg och att peptidoglykanlagret är skyddat av ett yttre membran (Kåhrström, 2015).

Ling *et al.* (2015) försökte vidare att skapa resistens mot teixobactin genom att utsätta stammar av *S.aureus* och *M.tuberculosis* för låga nivåer av teixobactin (under MIC-värdet) i mediet under 25 dagar men detta lyckades inte skapa resistent stammar. Inbindningen till lipider tros vara den ena viktiga faktorn till att ingen resistensutveckling kunde observeras. Den andra faktorn tros vara teixobactins förmåga att inhibera två olika produkter (lipid II och lipid III). Detta till skillnad när målet för antibiotikan är ett protein vilket ofta leder till att bakterier lättare utvecklar resistens (Kåhrström, 2015; Wright, 2015).

Ofta har man kopplat oförmåga att bilda resistent stammar i *in vitro*-försök till toxicitet för däggdjursceller. Detta gjorde att toxiciteten undersöktes för teixobactin i två olika cellinjer utan att toxicitet kunde påvisas (Ling *et al.*, 2015).

Musförsök genomfördes där musmodellen infekterades med MRSA intraperitonealt med en dos som normalt leder till 90% dödlighet. En timme postoperationellt introducerades teixobactin intravenöst i olika doser. Alla de behandlade djuren överlevde och ett PD₅₀-värde (Protective dose) räknades fram för teixobactin (PD₅₀ = 0.2 mg/kg). Detta kan ställas i relation till PD₅₀ som är 2.75 mg/kg för vancomycin, det huvudsakliga antibiotikat som används vid MRSA-infektioner. Teixobactin visade även upp mycket goda resultat i en modell som infekterades med *Streptococcus pneumoniae* (Ling *et al.*, 2015).

NovoBiotic Pharmaceuticals fick i oktober 2015 anslag för att undersöka effekten av teixobactin mot *M.tuberculosis* (NovoBiotic Pharmaceuticals, 2015). Teixobactin skall förhoppningsvis studeras i kliniska studier under 2017 (Piddock, 2015).

DISKUSSION

Problemområden inom human- och veterinärmedicinen

Alarmerade rapporter om resistensutveckling släpps från myndigheter över hela världen (ECDC, 2015; WHO, 2014). Stora problem ses vid infektion av flertalet bakterier och resistensutveckling utgör ett allvarligt hot mot den globala hälsan. Begreppet ”One health” har aldrig varit viktigare eftersom resistensutveckling i många fall är överförbar mellan bakterier och många av bakterierna, exempelvis MRSA och ESBL-producerande *Enterobacteriaceae*, är zoonoser (Collignon, 2015; Swedres-Svarm, 2014). MRSA representerade över 25% av de isolerade *S.aureus* isolaten i 7 av 29 medlemsländer inom EU/EEA och SVA visade i sin senaste sammanställning att hundar och katter till stor del bär på samma stammar som människor och smittspridning sker troligtvis från framförallt människor till djur (Swedres-Svarm, 2014). Problemen är fortsatt relativt små i Sverige men en ökande trend av MRSA ses i Sverige och med ett allt ökande resande med eller utan sällskapsdjur ökar risken för smittspridning till våra breddgrader (Swedres-Svarm, 2014).

Några av de allra största problemen inom humanmedicinen är de svårbehandlade gramnegativa bakterierna såsom ESBL-producerande *E.coli* och *K.pneumoniae* (WHO, 2014; ECDC, 2015). Dessa infektioner står i värsta fall helt utan behandlingsalternativ vilket främst gäller för karbapenem-resistenta stammar, så kallade ESBL_{CARBA}. Över 60% av isolerade *K.pneumoniae* från Grekland visade sig vara ESBL_{CARBA}-producerande vilket är högst oroande (ECDC, 2015). I Sverige har vi även här än så länge en gynnsam situation men trenden är ökande. Förekomsten hos djur i Sverige är fortsatt låg med undantag för ESBL-producerande *E.coli* hos slaktkyckling som utgjort ett problem men är minskande (Swedres-Svarm, 2014).

Minska resistensutvecklingen

Ett gemensamt grepp inom både human- och veterinärmedicinen är nödvändigt för att ändra den rådande situationen (Collignon, 2015). Den problematiska situation som vi ser idag beror dels på en alltför nonchalant användning av antibiotika inom både human- och veterinärmedicinen. Detta har på senare år fått till följd att flertalet myndigheter utarbetat riktlinjer för att begränsa användningen av antibiotika och framhålla att en förnuftig användning är att eftersträva (Törneke *et al.*, 2015). Den eskalerande resistensproblematiken som observerats de senaste 10-20 åren beror också dels på att det inte släpps lika många nya preparat längre (Fair & Tor, 2014). Nästan samtliga existerande antibiotikaklasser upptäcktes mellan 1940 och 1960. En av anledningarna till att resistensutvecklingen hållits någorlunda under kontroll, trots oförsiktig användning, tills för 10-20 år sedan, beror till stor del på att man kunnat tillverka analoger till existerande antibiotika och på så sätt hållit jämna steg med resistensutvecklingen. Analogor har varit framgångsrika men de kan inte modifieras i all oändlighet från en ursprunglig molekyl och ärver i viss grad resistensproblemen som finns hos ursprungsmolekylen (Coates *et al.*, 2011). Detta gör att nya antibiotikaklasser med en ny verkningsmekanism anses nödvändigt för att återigen få kontroll över resistensproblemen (Fair & Tor, 2014).

Den framgångsrika metod som användes mellan 1940- och 1960-talet byggde på screening av naturliga produkter och kallades Waksmans plattform men övergavs då det bakteriella

materialet som fanns tillgängligt ansågs uttömt (Lewis, 2013). Screeningen av bakterier genomfördes genom odling på traditionellt media, som agarplattor eller flytande media. Uppskattningsvis utgör den fraktion som kan odlas på traditionella media endast 1% av den totala bakteriella floran (Pham & Kim, 2012).

En återuppväckning av Waksmans plattform och därmed screening av naturliga bakterieprodukter möjliggörs nu då en metod utvecklats för att odla tidigare icke-odlingsbara bakterier (Nichols *et al.*, 2010). Detta utgör ett lovande angreppssätt och skulle öppna upp enorma möjligheter att leta efter naturliga antimikrobiella substanser. Genom användningen av *iChip* har nya bakteriestammar identifierats och potentiellt har nya familjer odlats fram. Även om potentialen för traditionellt icke-växande bakterier är enormt stor så kvarstår fortfarande ett problem att få majoriteten att växa (Nichols *et al.*, 2010). I studien som genomfördes av Ling *et al.* (2015) sågs en tillväxt av 50% jämfört med 1% på traditionellt media. Bakteriematerialet som isoleras med *iChip* är mängdmässigt litet och behöver överföras till traditionellt media och amplifieras för att avancerade studier ska kunna genomföras. Denna överföring är fortfarande problematisk och ca 10-15% av den totala bakteriemängden kunde överföras (Sherpa *et al.*, 2015). Trots att endast 10-15% av bakterierna i jord- och vattenprover kunde förmås att växa tillräckligt innebär det en tydlig förbättring än tidigare och materialet som kan undersökas för antimikrobiell aktivitet är i storleksordningen en tiopotens större än tidigare (Sherpa *et al.*, 2015).

Teixobactin

Några år efter publiceringen av *iChip*-tekniken kom den första antimikrobiella substansen. En screening med avseende på antibakteriell aktivitet genomfördes av 10000 framrenade extrakt som ströks på plattor med växande *S.aureus*. En substans från en ny art av β -proteobakterier fick namnet teixobactin (Ling *et al.*, 2015).

Teixobactin hämmar cellväggens syntes genom att binda till två lipider, lipid II och III, som är föregångare till peptidoglykan respektive teikonsyra. Verkningsmekanismen är helt skild från övriga kända antibiotika och tillhör därför en helt ny klass (Ling *et al.*, 2015).

Teixobactin visade upp en väldigt god antimikrobiell aktivitet *in vitro* mot grampositiva bakterier inklusive flera mycket svårbehandlade resistenta bakteriestammar såsom MRSA, VRE samt de mycket svårbehandlade infektionerna från *M.tuberculosis* och *Cl.difficile*. Teixobactin var överlägsen i avdödandet av *S.aureus* och VISA (Vancomycin intermediate resistant *S.aureus*) jämfört med vancomycin, substansen som normalt utgör behandlingsalternativet vid MRSA-infektioner (Ling *et al.*, 2015).

In vivo-försök i mus genomfördes också där teixobactin var mer effektivt än vancomycin att behandla MRSA. Ett PD₅₀-värde räknades fram för teixobactin till 0.2mg/kg, vilket skall jämföras med PD₅₀ som är 2.75 mg/kg för vancomycin (Ling *et al.*, 2015).

Författarna Ling *et al.* (2015) försökte att skapa resistens mot teixobactin men lyckades inte genomföra detta trots att stammar av *S.aureus* och *M.tuberculosis* utsattes för låga nivåer av substansen under totalt 25 dagar. Svårigheten att skapa resistenta bakterier mot teixobactin tros bero på dels att substansen riktar sig till lipider istället för proteiner och dels eftersom två

produkter inhiberas. Frånvaron av resistensutveckling som uppmärksammats verkar lovande för teixobactin men till exempel vancomycin som också verkar via lipider i cellväggen utvecklade resistens även om det tog ca 30 år innan det observerades (Kåhrström, 2015; Wright, 2015).

Teixobactin ser ut att bli en lovande antimikrobiell substans men verkar tyvärr inte mot de mest akuta svåra gramnegativa infektionerna. Anledningen till det tros vara det yttre membranets skyddande verkan hos gramnegativa bakterier och det faktum att de saknar teikonsyra i sin cellvägg (Kåhrström, 2015).

Slutsats

I inledningen av denna litteraturstudie ställdes frågan om användandet av icke-odlingsbara bakterier och *iChip*-tekniken skulle kunna vara lösningen på bristen på effektiva antibiotikakandidater. Svaret på den frågan är omöjligt att ge i dagsläget men användningen av icke-odlingsbara bakterier utgör ett mycket lockande alternativ med hög utvecklingspotential. Den mängd data som blir tillgängligt för screening genom *iChip*-tekniken skulle kunna föra antibiotikautvecklingen tillbaka till en ny guldålder. Detta kanske får de stora läkemedelsbolagen att åter igen satsa nödvändiga resurser på antibiotikautveckling. Tillsammans med utarbetade nationella och internationella riktlinjer för antibiotikaanvändning kan det vara den utvecklingsväg som behövs för att vända den negativa trenden av antibiotikaresistens.

Upptäckten av *iChip* har redan genererat en potentiellt effektiv substans, teixobactin, mot svårbehandlade grampositiva bakterier. Substansen som beräknas gå in i kliniska prövningar under 2017 tillhör en helt ny klass av antibiotika och är överlägsen vancomycin med avseende på förmåga att hämma MRSA i både *in vitro* och *in vivo*-försök. Författarna försökte skapa resistens mot teixobactin utan framgång vilket tyder på att målstrukturerna inte är så enkla att förändra. Det betyder dock inte att resistens kommer utebli för teixobactin. Historiskt sett så har samtliga antibiotika som introducerats utvecklat resistens inom loppet av 1-30 år. Resistensen utvecklas bara olika snabbt beroende på antibiotikans målstruktur. Upptäckten av teixobactin är den första nya antibiotikaklassen på flera decennier men det är inte substansen i sig som är intressantast utan på det sätt upptäckten gjordes.

Problemen kvarstår dock ännu hur man ska kunna komma åt de ytterst svåra infektionerna orsakade av multiresistenta gramnegativa bakterier. Det kanske är så att det i den enorma pool av tidigare icke-odlingsbara bakterier finns antimikrobiella substanser verksamma mot just gramnegativa bakterier som väntar på att bli upptäckta.

REFERENSLISTA

- Clardy, J., Fischbach, M.A. & Walsh, C.T. (2006). New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*. 24:1541-1550.
- Clatworthy, A.E., Pierson, E. & Hung, D.T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*. 3: 541- 548.
- Coates, A., Hu, Y., Bax, R. & Page, C. (2002). The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 1: 895-910.
- Coates, A.R.M. & Hu, Y. (2007). Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *British Journal of Pharmacology*. 152: 1147-1154.
- Coates, A.R.M., Halls, G. & Hu, Y. (2011). Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology*. 163: 184-194.
- Collignon, P. (2015). Antibiotic resistance: are we all doomed? *Internal Medicine Journal*. 45: 1109-1115.
- ECDC. (2015). Annual epidemiological report 2014: Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections.
http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1292
- Fair, R.J. & Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21th century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*. 6: 25-64.
- FAO/OIE/WHO. (2016). WHO, FAO and OIE unite in the fight against antimicrobial resistance.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/FAO_OIE_WHO_AMRfactsheet.pdf
- Fischbach, M.A. & Walsh, C.T. (2009). Antibiotics for emerging pathogens. *Science*. 325:1089-1093.
- Frieden T.R., Brudney, K.F. & Harries A.D. (2014). Global tuberculosis: perspectives, prospects and priorities. *Journal of the American Medical Association*. 312: 1393-1394.
- Kaeberlein, T., Lewis, K. & Epstein, S.S. (2002). Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*. 296: 1127-1129.
- Kährström, C.T. (2015). Antibacterial drugs: A new drug for resistant bugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 14: 94.
- Levine, D.P. (2006) Vancomycin: a history. *Clinical Infectious Diseases*. 42 (Suppl 1): S5-S12
- Lewis, K. (2012). Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. *Nature*. 485:439-440.
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 12: 371-387.
- Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schäberle, T.F., Hughes, D.E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V.A., Cohen, D.R., Felix, C.R., Fetterman, K.A., Millett, W.P., Nitti, A.G., Zullo, A.M., Chen, C. & Lewis K. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517: 455-459.
- Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E.M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K. & Epstein, S.S. (2010). Use of *IChip* for High-Throughput *in situ* cultivation of “uncultivable” microbial species. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 2445-2450.
- NovoBiotic Pharmaceuticals (2015-10-27). Press releases. <http://www.novobiotic.com/news/> [2016-03-03].

- Pham, V.H.T. & Kim, J. (2012). Cultivation of uncultivable soil bacteria. *Trends in Biotechnology*. 30: 475-484.
- Piddock, L.V.J. (2015). Teixobactin, the first of a new class of antibiotics discovered by *iChip* technology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 70: 2679-2680.
- Sherpa, R.T., Reese, C.J. & Aliabadi H.M. (2015). Application of *iChip* to grow “uncultivable” microorganisms and its impact on antibiotic discovery. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 18: 303-315.
- Stewart, E.J. (2012). Growing uncultivable bacteria. *Journal of Bacteriology*. 194: 4151-4160.
- Swedres-Svarm (2014). Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden. <https://www.folkhalsomyndigheten.se/pagefiles/20281/Swedres-Svarm-2014-14027.pdf>
- Törneke, K., Torren-Edo, J., Grave, K. & Mackay, D.K.J. (2015). The management of risk arising from the use of antimicrobial agents in veterinary medicine in EU/EEA countries – a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 38: 519-528.
- Zaffiri, L., Gardner, J. & Toledo-Pereyra, L.H. (2012). History of antibiotics: From Salvarsan to Cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*. 25: 67-77.
- Zaffiri, L., Gardner, J. & Toledo-Pereyra, L.H. (2013). History of antibiotics: From Flouroquinolones to Daptomycin (Part 2). *Journal of Investigative Surgery*. 26: 167-179.
- WHO (2012). The evolving threat of antimicrobial resistance – Options for action. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44812/1/9789241503181_eng.pdf
- WHO (2014). Antimicrobial resistance – Global report on surveillance. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1
- Wright G. (2015). Antibiotics: An irresistible newcomer. *Nature*. 517: 442-443.